



化學感測器研製與應用-(子計畫五)

生化感測器研製之發展策略研究與應用之探討

Strategies and Applications for the Electrochemical Biosensor Development

計畫編號：NSC 87-2113-M-032-012

執行期限：86/08/01 ~ 87/07/31

主持人：林孟山

淡江大學化學系

副教授

微縮送

PART I

一、中文摘要(關鍵詞：苯胺，脈衝處理技術，自動流注系統)

苯胺為一種廣泛被應用在染料、農藥及橡膠等工業製程上之化學原料，它同時亦是一種致癌的物質，雖然苯胺具有電活性可以電化學方法來測定，但偵測的同時會伴隨電聚合反應，阻礙後續電反應之發生或稱電極毒化，此現象之發生使得偵測訊號隨著偵測時間的增長而減小，故無法以電化學法直接達到準確定量之要求。本研究乃利用一簡單之脈衝技術，施加 ± 1.8 伏特(頻率為 500 Hz)的方形脈衝波，藉以清除電極表面的毒化物質，使已被毒化的電極表面得以再生。本技術之運用可使苯胺於偵測時不再受電極毒化的影響，其結果顯示連續測定苯胺氧化訊號 20 次之相對標準偏差僅為 0.62%，偵測極限為 6.48 ppb (0.05 μ M)，且其線性範圍達 21.3 ppm (或 165 μ M，相關係數 $R=0.9997$)。

Abstract (Keywords: aniline, pulse regeneration, FIA)

Aniline is widely used raw chemical material in various industrial processes, such as dye, pesticide and rubber industries. It has been suspected as a carcinogen under long-term exposure. No electrochemical scheme has been developed for the determination of aniline yet. A severe electrode faulting problem from the aniline oxidation hinders the subsequent electrochemical reaction. The consequence of the polymerization reaction decreases the further mass transfer behavior. In current project, we report an electrode surface regenerable procedure to remove the faulting polymer on electrode surface. By applying a ± 1.8 V pulse train to the electrode after each electrochemical measurement, the following signal can be maintained steadily with a relative standard deviation 0.62% ($n=20$). In contrast, the electrochemical signal decreases 49% from the first

determination with a relative standard deviation 23.3% after successive twenty measurement. The estimated detection limit ($S/N=3$) is 6.48 ppb (0.05 μ M) and the linearity of the response is up to 21.3 ppm (or 165 μ M with correlation coefficient, $R=0.9997$).

二、計畫源由與目的

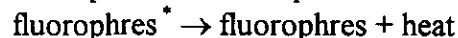
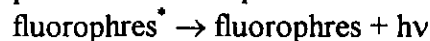
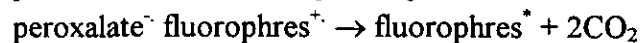
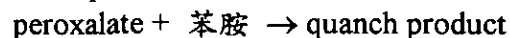
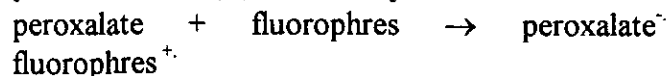
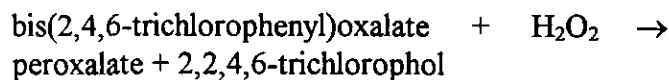
苯胺在化學工業上的使用非常頻繁，特別是使用在染料、農藥、炸藥及橡膠的工業製程上⁽¹⁾⁽²⁾。由於苯胺在染料組成上為一個重要的助色基團，而且因為動物纖維上帶有很多的羧基可與苯胺上的胺基結合增加染料的附着力，因此在動物纖維染料的製作苯胺是一個不可或缺的原料⁽³⁾。另外在 phenylurea 系列的農藥製作上則是利用苯胺來進行衍生化而製成各式的農藥。根據美國相關單位的調查結果，光是美國其一年對苯胺的使用量竟超過 9 億磅⁽⁴⁾。對於這麼高的使用量，不禁使我們開始擔心 aromatic amine 對於生活環境及人體究竟有何影響。

而 aromatic amine 及其衍生物對人體最主要的影響是由於動物體中的 hemoglobin 中心的鐵會受到苯胺及其代謝物如 phenylhydroxylamine、2-aminophenol 和 4-aminophenol 的氧化形成 methemoglobin，使得 hemoglobin 中心的鐵失去與氧結合的能力，而影響了動物的血液中紅血球對氧氣的傳送能力。⁽⁵⁾而且加上苯胺會與紅血球發生 covalent binding 產生巨分子的沈澱物沈積在脾臟(spleen)及肝臟(liver)，因而影響脾臟及肝臟的健康⁽⁶⁾⁽⁷⁾。另外長期接觸苯胺也會導致癌症的發生，根據美國環保署的危險評估中顯示，在日常飲用水終止要含有超過 6ng/ml 的苯胺便有致癌的可能性⁽⁸⁾。由這些危險評估我們可看出苯胺的污染是不容忽視的，也更凸顯了其分析的必要性。

由於苯胺的使用量頗大，而且其對人體的傷害也是不容忽視的，因此發展一套快速、準

確、便宜的苯胺偵測方法是很重要的。

1986 年 Gooijer⁽⁹⁾等人利用化學放光的偵測方式來偵測苯胺，其偵測原理如下：



其利用苯胺對 peroxalate 的 quench 反應，抑止了化學放光反應的進行，故於偵測化學放光減弱的程度，來測定苯胺的濃度，對苯胺的偵測極限可達 18ng。

1986 年 N. Ishibashi⁽¹⁰⁾利用毛細管柱的氣相層析儀分離環境中的苯胺及其衍生物，並利用 Multiphoton ionization mass spectrometry 選擇不同的波長，將毛細管柱無法分離的同分異構物游離，再經飛行時間分析儀來測得所分離出的苯胺之濃度，藉由此方法不但可偵測出苯胺的同分異構物，而且偵測極限可達 100ng。

1997 年 S. D. Huang⁽¹¹⁾等人利用 Solid-phase microextraction(SPME)的分離技術來分離環境中苯胺於水的含量，並配合了火焰離子化偵測器來偵測苯胺的濃度，所得對苯胺的偵測極限為 16ng/ml。

1992 年 Chang⁽¹²⁾利用比色法(colormetric)來分析苯胺的含量。由於苯胺在含有 o-cresol 及 ammonia 的溶液中會與其發生反應並產生顏色的變化，可藉由顏色的變化來推算出苯胺的濃度。其偵測極限可達 240μg/ml。

1980 年 Lores⁽¹³⁾利用高效能液相層析法(HPLC)配合 Electrochemical detector(ECD)來偵測苯胺。其利用 HPLC 來分離苯胺並將 EC detector 的操作電位固定在 +1.1V 下進行偵測，可測得苯胺的氧化訊號，其偵測極限可達 50ppb，可是由於偵測苯胺氧化時會伴隨著苯胺的聚合反應而毒化電極，所以作者於每次偵測後將電極置於強酸及強鹼下清洗，並利用沸水浸泡一個小時用以清除電極表面上吸附的毒化物質。

在上述的苯胺偵測方法中，除了化學放光法、GC-Mass 及電化學偵測有較好的偵測極限

已符合美國環保署制訂的標準外，其他的方法接無法達到偵測低濃度的標準。可是化學放光及 GC-Mass 的偵測方法卻有操作繁複以及設備昂貴的缺點，難以普及化，無法有效的運用在苯胺的現場監測上。而利用電化學偵測方式直接偵測卻有電極毒化問題阻撓，而無法達到有效的偵測。

由於直接偵測苯胺氧化的同時其會伴隨著聚苯胺的產生，因而在電極面上覆蓋了一層層聚苯胺的高分子薄膜-polyaniline。當累積的聚苯胺薄膜越厚時，被分析物會因質量傳送的困難而無法順利到達偵測的電極表面上，使得電極失去活性偵測訊號隨著偵測時間的增長而減小，因而無法達到準確的定量。所以電極毒化一直是電化學方法偵測苯胺的一個令人困擾的問題。

電極表面的再生

對於易毒化電極的物質之偵測，能隨時保持一個良好的電極活性及乾淨的電極表面是分析上所訴求的重點，所以汞電極一直是較受歡迎的運用工具，但是由於汞電極的工作電位區間的問題而受到限制，故於陽極偵測時固態電極還是為常被利用的工具。但是相較於可更新表面的汞電極，所使用的電極毒化問題在固態電極上更顯得嚴重。因此解決固態電極所面臨的毒化問題，一直是電化學家所關心的問題。所以在過去曾經有利用化學氧化處理⁽¹⁴⁾、雷射脈衝處理⁽¹⁵⁾、高溫處理⁽¹⁶⁾及陽極處理法⁽¹⁷⁾來處理活化電極，並且皆能有效的處理電極。

化學氧化處理便是利用鉻酸、濃硫酸及過氯酸等具強氧化能力的物質，將吸附於電極表面阻礙電子傳遞的物質氧化去除，以得到一乾淨的電極表面。

1973 年 Humffray⁽¹⁸⁾將電極置於鉻酸溶液中浸泡 5 秒至 30 分鐘，利用鉻酸的強氧化能力來氧化吸附於電極表面的物質，藉以處理活化電極，結果顯示經活化的電極偵測 ferricyanide/ferrocyanide 時的電子轉移速率，比未經活化之電極之電子轉移速率提高 100 倍之多。推測可能原因為電極表面較為乾淨，表面積大，反應的位置較多，因此電子轉移的速率增快。1985 年 Kuwana⁽¹⁹⁾利用傳統的拋光方式來處理玻璃碳電極及白金電極，並且利用過氯酸

和硫酸來做白金電極的最後處理工作。所得結果與 Humffray 相同，皆能藉由活化處理來增加電子轉移速率。

高溫處理便是將電極利用真空高溫處理，將吸附在電極表面上的毒化物質暴露在 500 °C 以上的真空環境，利用高溫將毒化物質分解，以達到活化電極的效果。

1983 年 Wightman⁽²⁰⁾ 利用熱處理來增強玻璃碳電極的電化學可逆性 (electro-chemical reversibility)。他們將電極置於低壓的系統下，加熱 520-540 °C，在 1 torr 的低壓下持續 2-24 小時，將 ferrocyanide/ferrocyanide 的氧化還原電位差由原先 $\Delta E=121\text{mV}$ 縮減成 $\Delta E=64\text{mV}$ 。

1985 年 Kuwana⁽²¹⁾ 等人利用高溫處理來活化電極。他們將玻璃碳電極置於高真空系統下施予 725 °C 的高溫處理十分鐘，將 ferrocyanide/ferrocyanide 的氧化還原電位差由原先 $\Delta E=108\text{mV}$ 縮減成 $\Delta E=64.5\text{mV}$ 。Kuwana 並於處理過後利用 X-ray 來觀測電極表面，發現經熱處理後的電極表面氧原子與碳原子的比例增高 (O/C)，經鑑定後推測為電極表面上的碳因高溫氧化而產生 1,4-dihydroquinone 及 1,2-dihydro-quinone 而加速了電極表面電子的轉移速率。

雷射脈衝處理是利用雷射光源產生的高能量雷射脈衝，將電極暴露於雷射脈衝下，吸附於電極表面的毒化物質則因高能量的施加而分解，因而達到清理電極表面的效果。

1986 年 Poon 和 McCreery⁽²²⁾ 使用雷射 (Laser) 來活化處理遭受毒化的玻璃碳電極表面。經過短暫 Laser 照射後的電極表面，電極表面毒化現象便可得到有效地改善。隔年 Poon 和 McCreery⁽²³⁾ 則更進一步地將雷射活化電極技術運用於 pulse voltammetry 上，用來偵測易毒化電極的物質 phenol、dopamine 及 hydroquinone，其利用 Laser 來處理被毒化的玻璃碳電極的表面，成功地防止 phenol 所造成之電極毒化現象。並發現經由雷射脈衝處理過的電極，其電子轉移速率增加了 10~1000 倍。

陽極處理法便是利用施加高的氧化電位於被毒化的電極表面上，將吸附電極面上的毒化物質氧化剝除，有時更配合強酸來協助毒化物質的氧化，是目前較為普遍的電極活化處理

方法。

1976 年 Johnson⁽²⁴⁾ 利用電化學方法來活化白金電極的表面。在 HClO_4 、 $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ 及 NaCl 的溶液下，施加一 +3V 的電壓持續 30 秒至 2 分鐘，成功的清除了 phenol 的毒化，並且在沒有預濃縮的情況下提高白金電極對 phenol 的偵測極限至 1ppb。

1989 年 Johnson⁽²⁵⁾ 利用 pulse coulometric detection(PCD) 和 potential-sweep pulse coulometric detection(PS-PCD) 的方法成功的解決了 amino acid 對金電極的毒化問題。該系統是將偵測過 amino acid 的金電極上施加 +1050mV 的電位氧化吸附在電極表面的分析物，隨即將電位調至 -550mV 將被氧化的分析物脫附，如此於偵測後附加清除電極的動作，以保持電極的清潔。利用此方法可使偵測 lysine 時的偵測極限達 75pmol。

1986 年 Nagaoka 和 Yoshino⁽²⁶⁾ 利用電化學方法來活化電極表面。在 phosphate buffer pH 7 的條件下，先將電極外加 +1.8V 的電壓處理 5min，隨後將電壓調整到 -1.5V 處理 1min，處理後之玻璃碳電極表面形成了 *o*-benzoquinone 和 *p*-benzoquinone 的特性官能基。此一預處理之電極對於 hydroquinone 具有相當強之吸附特性，可使原先在電化學為不可逆(irreversible)之 hydroquinone 轉變為電化學可逆(reversible)。

同時 Inagaki⁽²⁷⁾ 亦曾提到，將碳電極置於濃硫酸溶液中施加電位進行活化處理時，當施加電位介於 +0.8V 及 +1.2V 時溶液中的硫酸根離子會插入至碳電極的內層，碳層間距離因此而變大，當活化處理的電位高於 +1.5V 時，被硫酸根離子撐開的碳層便被氧化並產生 quinone 及 phenol 等官能團，若再將處理電位調至還原電位時，碳層表面的官能機則被還原同時插入的硫酸根離子也隨即離開，此時被撐開的碳層則被破壞呈不規則狀，且由於電極面被破壞使得偵測時的背景電流也跟著提高。

Engstrom 和 Strasser⁽²⁸⁾ 曾於中性的電解質條件下探討碳電極表面的狀態，其將玻璃碳電極置於 0.1M KNO_3 溶液下，並持續施加 +1.8V 之電位 5 分鐘以對電極面進行氧化，結果發現氧化過後的玻璃碳電極表面之親水性提高，作者推測主要是因為電極表面有氫氧化物的產生

導致電極表面親水性的提高。

Bard 曾經針對陽極處理法處理過的電極表面狀態進行深入探討⁽²⁹⁾，藉由 X-ray 的鑑定，Bard 發現當對玻璃碳電極施加高氧化電位時，電極表面的碳會被氧化形成不導電的 graphite oxide，此時電極表面會因為 graphite oxide 的生成而阻礙了電子的傳遞，造成背景電流變大，此時如果再施予一還原電位，電極表面的 graphite oxide 則會還原成為 hydroquinone，而電極表面也會因 hydroquinone 的生成而增加電子的傳遞速率。繼 Bard 之後 Kulys⁽³⁰⁾、Royer⁽³¹⁾、Kuwana⁽³²⁾ 皆相繼提出於電化學處理過後的電極表面發現有 hydroquinone 的產生，也證實因為 hydroquinone 的產生而增加了電極表面電子的傳遞速率。

1988 年 Lin⁽³³⁾ 利用不同頻率及不同功率的脈衝解決了於 voltammetry 偵測 phenol、dihyronic-cotinamide adenine dinucleotide (NADH)、chlorpromazine、uric acid、butylated hydroxyanisole(BHA)、和 dodecyl sodium sulfate 時對玻璃碳電極的毒化問題。

1985 年 Wang 和 Hutchins⁽³⁴⁾ 在飽和的氯離子溶液中，以交流電來處理玻璃碳電極表面，以增加電極的可逆性。他們將電極以 $\pm 6V$ ，頻率 35Hz 處理 5 分鐘，針對他們所測試的電活性物質，所有物質的 peak potential 均下降 110 至 300mV，而且偵測的靈敏度也大幅地提高。

自動流注系統和其在感測器評估之應用

在 1970 年代的中期，Ruzicka 和 Hansen⁽³⁵⁾ 首先利用自動流注分析法 (flow injection analysis) 來解決實驗室中大量的定量分析工作，於是一個自動化且可連續操作的分析工具開始被廣泛的運用。由於自動流注分析法有效快速的分析、分析物及藥劑的消耗量少、再現性佳、操作方便和構造簡單，組件價格便宜，實驗室內均可自行組裝，並可配合各種偵測器進行分析，如：電化學偵測器⁽³⁶⁾ (electrochemical detector)，原子吸收光譜⁽³⁷⁾ (atom absorption spectrom)，質譜 (mass)⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾，FTIR⁽⁴⁰⁾⁽⁴¹⁾ 等偵測器；由於這些優點，所以深受許多的研究工作者和分析家所喜愛的分析工具。目前以廣泛的

應用在藥物、食品、材料、農業、生物、化工、環境和臨床分析⁽⁴²⁾。

簡單的自動流注分析系統的是由流體推進器的蠕動泵浦，注射閥 (injection valve)，和一個定量樣品體積的樣品環線 (sample loop)、一些細的管線和偵測器所構成的分析系統。它的基本原理是利用在管路中不斷流動的流體，當做載體，再藉由注射閥將樣品注入流體中，樣品在流體中形成帶狀擴散，再流至偵測器中偵測。

從注入閥注入樣品時⁽⁴³⁾，當樣品帶流經管路會產生樣品帶變寬的現象。這是因為擴散現象造成了樣品的分散情形，分散的原因有兩個因素，一是樣品的流動：即是流體在流動時，中心部分的流速較比兩側的流速快，而造成樣品之前端呈拋物線狀向前流動。另一則是樣品的擴散：樣品在管線中，因為濃度差而產生的擴散現象，有橫向和縱向兩種擴散方式，縱向擴散是一種平行於溶液流動方向的擴散；而縱向擴散即是垂直於溶液流動方向的擴散。在流動的管中，縱向擴散比起軸向擴散對於分散程度的影響是非常小，層流和縱向擴散則是造成樣品分散的最主要的原因。

Ruzicka 和 Hansen，又將分散度做以下的定義：

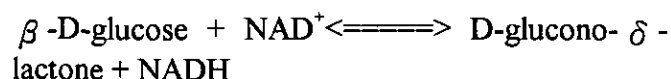
$$D = C_0 / C_{\max}$$

C_0 是注入分析樣品的濃度，而 C_{\max} 是指樣品溶液在注入自動流注系統後，於反應繞管中進行分散過程，與載流體相互混合而被稀釋後的濃度。而樣品的分散度受到三個變數所影響，即是樣品體積、反應管子的長度和溶液的流速。當注入樣品體積愈小時，樣品的分散度也就愈大；若想要增加靈敏度，則可增加注入樣品的體積；反之，若樣濃度太高，也可以藉由減小樣品注入的體積，以達到稀釋的效果。另外當反應管的長度愈長，分散度則愈大。此外，反應管子的內徑愈小，以及溶液之流速愈慢，都將導致分散度變大。

Heider⁽⁴⁴⁾ 於 1984 年利用共價鍵法將 glucose oxidase 鍵結於網狀多孔性的碳電極上製成葡萄糖生化感測器，結合自動流注系統分析系統，於 +0.9 V 的電位下 (vs. 甘汞電極) 偵測 glucose oxidase 與葡萄糖反應所釋出之 H_2O_2 的氧化電流，其線性範圍是 2.5 mM - 10 mM。

György⁽⁴⁵⁾ 在 1985 年將固定有 glucose dehydrogenase (GDH) 的酵素反應器連接於自動流注系統分析系統的注入閥和偵測器之間，並於偵測器中的石墨電極吸附上一層 Meldola blue 作為催化劑，發展成為葡萄糖偵測系統，當含有 nicotinamide (NAD⁺) 的葡萄糖溶液被注入時，經酵素反應器進行下列反應：

GDH

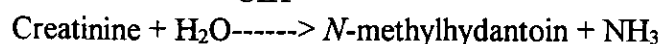


所形成的 NADH 隨著載體進入偵測器中，在 Meldola blue 的催化下可於 0 mV 電位下可測得 NADH 的氧化電流，利用此系統來偵測葡萄糖，可避免維他命 C，尿酸和 quinone 的干擾。

Sanghera⁽⁴⁶⁾ 於 1986 年利用自動流注系統分析系統結合一個修飾 glucose oxidase 的白金電極之電化學偵測器，以進行葡萄糖的偵測。作者將白金電極利用陽極處理在白金電極表面上形成 Pt-O 使其與 3-Aminopropyl-triethoxysilane 形成共價鍵，再利用 Glutaraldehyde 固定酵素於電極面上，製成葡萄糖生化感測器。此感測器於酸鹼值為 5.5 之下，流速為 3.2 cm³/min 之下偵測葡萄糖的線性範圍可達 0.1-30 mM。

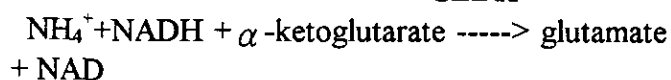
Fredrik 於 1986⁽⁴⁷⁾ 年利用酵素化的流注系統並結合電化學偵測器分析人體中的 creatinine，其於流注系統中的反應管柱中固定 creatinine iminohydrolase (CIH)，藉由 creatinine iminohydrolase 對 creatinine 進行水解反應產生 N-methylhydantoin 和胺，其所產生胺可經由氧化銦半導體的電極中偵測出其濃度，以接間的估計 creatinine 的濃度，其反應式如下：

CIH



由於人體中的尿液和血液所含胺離子的比例很高，影響了偵測的準確性，因此作者於管柱中固定 glutamate dehydrogenase，並在載體中加入 NADH 和 α -ketoglutarate，藉由 NADH 和 α -ketoglutarate 的反應消耗胺離子以去除胺離子的干擾，反應式如下：

GLDH

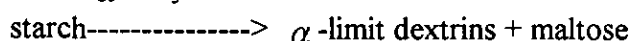


利用此系統來分析人體中的 creatinine，其偵測極限為 0.2 μM ，線性範圍可達 30 μM 。

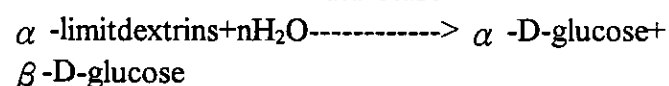
Ikariyama 和 Yukiashi 於 1989⁽⁴⁸⁾ 年利用白金和 glucose oxidase 共沈積於微電極上，並將此酵素之微電極施加 1.2V 之電位予以陽極化，製成一個葡萄糖生化感測器，並配合自動留住系統來對葡萄糖進行偵測。利用此系統偵測葡萄糖其線範圍 50 μM 至 20 mM，偵測極限為 0.5 μM 。

Gorton 於 1990⁽⁴⁹⁾ 年於自動流注系統分析系統內連接三個反應器。固定不同酵素，以偵測澱粉內葡萄糖的含量。三個反應器所固定的酵素分別為 α -amylase、amylglucosidase、mutarotase 和 glucose oxidase，其偵測原理如下：

α -amylase



mutarotase



GOx



mutarotase



所產生的 H₂O₂ 可藉由金與白金的合金電極於 600 mV 的電位下測得氧化訊號，以達到間接測量澱粉內葡萄糖的含量之目的。利用此系統測量澱粉的線性範圍在 10 μM 至 0.6 mM 間。

本研究的目的

本研究的目的是在於發展一自動流注系統或 HPLC 可應用的電化學偵測器，以隨時監控環境中苯胺的量，以確保人體之健康，並同時利用一套有效而且操作簡易的電極再生技術，改善利用電化學方法直接偵測苯胺因電極的毒化而使得偵測訊號失真，使對於苯胺的偵測能夠達到更準確、更有效率之目的。並且由於 aniline 為農藥常見的代謝產物，我們也希望藉此發展出農藥的偵測技術。

三、研究方法與成果

研究方法

3.1 儀器

本實驗使用流動注入分析儀 BAS CC-5 Liquid Chromatography (Bioanalytical System, Inc., Indiana, U.S.A.) 配合電化學偵測器 BAS LC-4C amperometric detector (Bioanalytical System, Inc.) 來偵測電流，連接 WATSON MARLOW 302S pump (WATSON MARLOW) 並使用 PVC manifold tubing 0.88mm (WATSON MARLOW) 做為流體載送速度的控制，使用 Rheodyne 7125 injector (RHEODYNE, California, U.S.A.) 並配合 BAS 20 μ l、50 μ l、100 μ l 及 200 μ l 不鏽鋼 sample loop (Bioanalytical System, Inc.) 作為分析物注入系統。訊號以 Strip Chart Recorder (Alltech Linear, Nevada, U.S.A.) 作為記錄器。電化學反應槽含三電極系統，以 Ag/AgCl 電極(3M KCl)(Bioanalytical System, Inc.) 作為參考電極，工作電極為玻璃碳電極 (Bioanalytical System, Inc.)，並利用 Eppendorf 10 μ l~100 μ l micropipet (Hanburg, Germany) 作為小量體積之量取，酸鹼度之測量使用 Suntex pH meter (Taiwan)，藥品則以 Mettler AE200 balance (Zurich, Switzerland) 精密天平精確秤量至小數點以下四位，並使用 CREST Ultrasonic cleaner 清洗工作電極。

3.2 藥品

本實驗中所有藥品的配製皆使用 Milli-Q Reagent Water System 所製造出之蒸餾水配製。電極表面拋光研磨所使用之 0.1 μ m Aluminum oxide powder 購自 BaikaloX 公司(Charlotte, North Carolina, U.S.A.)。使用之藥品苯胺購自 Sigma (Saint Louis, Missouri, U.S.A.)。Imidazol、Natriumdihydrogenphosphate -2-hydrate、Sodium hydroxide (NaOH)、Tris(hydroxymethyl)amino methane、Potassium hexacyanoferrate(III) ($K_3Fe(CN)_6$) 購自 Riedel-deHaen (RDH, Seelze, Germany)。

3.3 操作步驟

利用 FIA 流注系統並配合以電極表面脈衝處理技術來進行 aniline 的偵測工作。所探討的

內容於結果與討論中詳述。

四、結果與討論

本研究是利用電化學方法來偵測苯胺，可是利用電化學方法直接測量苯胺會因電極的毒化現象而影響偵測訊號的再現性，因此本實驗於偵測苯胺的同時配合脈衝式電極再生技術來避免電極的毒化現象。由於電極再生處理的效果與施加脈衝的強度、脈衝的頻率以及脈衝施加時間的長短有直接的關係，因此以下將針對電極再生處理的效果及以此為基礎之苯胺感測器性能作逐一詳細的討論。

4.1 電極處理效率之研究

由於脈衝的電極再生技術其處理效率與脈衝強度，脈衝頻率及脈衝施加時間的長短有關，為了使電極再生處理效果達最佳化，針對所使用的脈衝強度，頻率及施加時間作一探討。

4.1.1 脈衝強度的探討

脈衝的強度於電極再生處理中是首要的影響因素，依不同的電極之毒化特性及毒化物質吸附能力之差異，必須使用不同強度的脈衝來處理電極表面。初步實驗發現，在連續氧化測定 150 μ M 苯胺的過程，電極靈敏度逐漸下降而訊號終至失真，探究其因，可能於氧化過程中所產生的苯胺氧化產物，瞬即進行自由基聚合反應⁽⁵⁰⁾。但聚苯胺毒化的電極，若施以 $\pm 1.8V$ 的脈衝強度來處理電極表面，其連續操作 12 次所得到的偵測訊號可保持其再現性為最佳 (RSD=0.8587%)，如圖一所示。而若使用較強或較弱的脈衝，發現偵測訊號的再現性則明顯變差，推測為使用較強的脈衝處理電極表面，電極面會因處理過度而遭受破壞，使得電極面積不規則變化而導致偵測訊號的再現性變差，而且所得到的背景電流也明顯增大。若使用較低強度的脈衝處理電極表面，則無法完全去除電極面上所吸附的聚苯胺，在連續操作下，電極面持續遭受聚苯胺的毒化，使得偵測訊號持續變小，故選用了電極再生效率較佳 $\pm 1.8V$ 的脈衝強度來做為後續條件的探討。

4.1.2 脈衝頻率的探討

由於脈衝的頻率也會影響再生處理的效果，因此針對不同的脈衝頻率作探討，本實驗研究了處理頻率介於 50 至 600Hz，其結果如圖二所示，脈衝頻率 200Hz 至 550Hz 皆有不錯的再生效果，其中以 500Hz(Pulse Width=1 msec)的脈衝頻率之處理效果為最佳，能有最佳偵測訊號再現性，其相對標準偏差為 0.59%，故後續研究均選擇脈衝頻率 500Hz 做後續的探討之脈衝處理頻率之最佳條件。

4.1.3 脈衝施加時間的探討

由於脈衝再生處理時間直接影響了電極再生處理的效果，因此對不同的處理時間作探討，實驗發現結果如圖三，若脈衝施加的時間不足，則吸附於電極表面的聚苯胺無法有效的去除，在多次操作後，毒化現象逐漸趨於嚴重，無法得到良好的偵測訊號再現性。但是若脈衝施加的時間過長，電極表面則會有處理過度的現象，導致在多次操作後偵測訊號逐漸變大，對相同濃度之分析物無法維持穩定之訊號，其主要原因推測為處理時間過長，電極表面因處理過度而遭受破壞，而致使碳電極表面積增大，使得偵測訊號隨著逐漸變大，因此本探討中選擇 105 秒的脈衝施加時間，主要是因為其有最佳偵測訊號再現性，相對標準偏差為 0.605%。

4.1.4 電極表面與脈衝再生技術性質之探討

電極處理條件經詳細研究探討後，所得到最佳化處理條件為脈衝強度 $\pm 1.8V$ ，脈衝頻率 500Hz，脈衝施加時間為 105 秒。其結果如表一所示。並於此最佳化條件下以定電位法對 150 μM 之苯胺做 18 次連續偵測，發現其訊號無明顯下降，且其背景電流特性無明顯改變峰高一致為 540.5 nA，其相對標準偏差 RSD=0.62%(圖四 A)，與未施予電極再生處理時的相對標準偏差 RSD=23.38%相互比較(圖四 B)，發現於偵測苯胺時配合脈衝再生技術，可完全避免聚苯胺的毒化，並可得到最佳化偵測訊號再現性。

由於本實驗是利用高頻率的脈衝波施加於電極表面，為觀察處理條件對電極表面狀態的影響，於是利用全反射的傅利葉轉換紅外線

光譜儀(FTIR)、紫外線光譜儀(UV)及差分脈衝伏安法(Differential Pulse Voltametry)分別來觀察當利用 $\pm 1.8V$ 頻率為 500Hz 脈衝波處理電極時電極表面是否與未處理之玻璃碳電極有明顯的變化。由所得到未經處理的電極及施加脈衝波處理過之 IR 及 UV 圖譜中相互比較，發現兩者的分析圖譜並未有任何差異，完全無任何吸收峰的產生(圖譜未示)。同時亦用差分脈衝伏安法觀察處理前與處理後之碳電極表面發現於 -0.2V 的電位有一還原峰的產生，經除氧時間的探討後證實，其為氧氣的還原峰(圖譜未示)，至目前結果並無發現有任何官能團的產生。McCreery⁽⁵¹⁾曾經提出在有氧氣的情況經 +2.04V 電極活化處理過的碳電極表面上，可能會有 phenol、carboxylic acid、carbonyl、lactone、o-quinone 及 p-quinone 等官能團的產生，而這些因碳電極表面被氧化後所產生的氧化物薄膜則為非導體，因而阻礙了電子的傳遞⁽⁵²⁾，該結論與本實驗觀察結果並不相符，可能源于不同的操作條件所致，而主要織布同處可能源于其操作電位保持恆在 +1.6V，可是因所使用的電解質溶液為 96% 的硫酸溶液，由於濃硫酸為強氧化劑，因此無須在很高的操作電位便可輕易的將碳電極表面氧化，產生 quinone 及 phenol 等官能團。

Bard⁽⁵³⁾也曾利用 X-ray 鑑定在酸性溶液下經陽極處理過的玻璃碳電極表面，發現當施加高氧化電位於電極面時，電極表面的碳結構會被破壞並且被氧化形成 graphite oxide，由於 graphite oxide 為非導電性物質，故在長時間施加高氧化電位時，電極偵測時所得到的背景電流會越來越大。而當對電極施予還原電位時，電極表面上的 graphite oxide 會被還原成 hydroquinone，不但增加電極表面的導電度，也增加了電極表面電子的傳遞速率。

於本研究中，由於使用 $\pm 1.8V$ 之脈衝波來處理電極表面時，其電位是於短時間內作多次的正負相位變化，藉由電極表面極性於瞬間多次的變換來達到剝除吸附於電極表面的毒化物質之效果，而電極表面並無觀察到氧化物增加，甚或因碳結構的破壞移動而造成的背景電流增加，故初步可能機制推測為在施加脈衝時電極表面的極性於瞬間作多次的變換，此時電極表面的電雙層的厚度也跟著改變，藉由電雙

層的反覆變化將吸附於電極面上的聚苯胺推離電極表面，以達到清除電極表面的目的。而且由於脈衝波是由一正一負的方波所組合而成，當施正電位的脈衝氧化電極過後隨即施予負電位的脈衝還原電極，由於所施加處理的時間非常短，因此對於電極表面上的破壞並不嚴重。不如 Engstrom 和 Strasser 持續施加電位來氧化電極面，故推測利用脈衝波來清除電極表面對於電極面的破壞能力並不如持續施加氧化電位劇烈，所以能夠完整的保持電極表面的狀態。

4.2 苯胺偵測條件之最適化

4.2.1 溶液 pH 質的探討

由於苯胺的氧化為受 pH 影響之相關反應，因此針對溶液酸鹼度對於偵測訊號的影響進行探討。於實驗結果發現，溶液的 pH 質越高，則所得到的苯胺氧化訊號越大(如圖五所示)，此現象是因為苯胺氧化時伴隨著質子的脫去，根據能斯特方程式，若溶液中氫離子濃度越高，則氧化苯胺所需施加的電位也就越高，故在 pH 質越低的溶液中所得到的苯胺氧化訊號也隨之變小，反之，在 pH 越高的溶液中所得到的苯胺氧化訊號也越大。

於本實驗中選定 pH 值為 7.5 的溶液來做探討，主要是因為當 pH 越高時，聚苯胺毒化電極的現象也相對提高，使得偵測訊號的再現性明顯變差。故雖然於 pH 為 7 時其訊號再現性最好，可是為求得較好的偵測訊號，於可容忍範圍內損失的些微的訊號再現性，選擇溶液 pH 值為 7.5(RSD=0.465%)來做探討。

4.2.2 電解質的探討

由於酸鹼值的改變會影響系統偵測的靈敏度以及電極表面受聚苯胺毒化的程度，因此為了控制系統在偵測過程中能有穩定的溶液酸鹼值，本研究共選擇了三種於 pH 為中性範圍時具有緩衝能力的電解質進行條件最佳化條件的探討。如圖六所示，這三種電解質分別為 imidazol、Tris(hydroxymethyl) aminomethane、phosphate buffer，所採用的 pH 值皆為 7.5，實驗發現在操作電位為 +0.7V(vs. Ag/AgCl)，固定流速，注入 150 μ l 之苯胺，連續操作其偵測訊號再現性皆相近，且於 phosphate buffer 下具有最佳的苯胺偵測靈敏度。同時圖六亦顯示，電解

質的種類並不影響電極再生的效果，故選擇 phosphate buffer 為偵測時的電解質溶液。

4.2.3 電解質濃度的探討

由於電解質的濃度影響偵測時的靈敏度，而且因為電解質的濃度直接影響化學反應的平衡⁽⁵⁴⁾，於低電解質濃度下對於化學反應的平衡並不會有影響，但是電化學偵測上卻會因為電解質的濃度過低使得溶液導電度不佳而影響偵測訊號的大小，因此本實驗探討了溶液 pH 值為 7.5 之不同濃度的電解質對偵測靈敏度之影響。研究中共探討濃度為 0.0125M、0.05M、0.075M、0.1M、0.125M 及 0.15M，pH 值皆為 7.5 之電解質。如圖七所示，當電解質濃度為 0.075M 時所得到的苯胺偵測電流訊號為最大，而且於連續操作中可以發現，於不同的電解質濃度下並不會對電極再生處理的效果有太大的影響，因此在本實驗中選擇了電解質濃度為 0.075M 之 phosphate buffer。

4.2.4 偵測電位的探討

由於苯胺的氧化會伴隨著聚苯胺的生成，所以當操作電位越高時，苯胺的氧化速率加快，而電極的毒化現象也隨著趨於嚴重，所以選擇合適的偵測電位是重要的。研究中探討了 +0.4V、+0.5V、+0.6V、+0.65V、+0.7V、+0.75V、+0.8V 及 +0.9V (vs. Ag/AgCl) 等八個操作電位。

由圖八顯示，當操作電位越高時，所得到之苯胺氧化電流雖然越大，而偵測訊號之再現性也隨著變差，主要原因是操作電位越高，電極受聚苯胺毒化的現象趨於嚴重，使用之前所探討的電極再生條件已不敷使用，無法完全清除電極面上所吸附的毒化物質，故本實驗中選用了 +0.7V 為偵測時的操作電位。

4.2.5 流速的探討

以安培法偵測分析物時，靈敏度的大小與分析物質傳(mass transfer)的速度有直接的關係。因此，以 FIA 系統做偵測時，可藉由載送流體流動的速度來控制分析物在電極面上所停留的時間，本研究共探討了 0.4、0.6、0.8、1.0、1.25、1.5、1.75 ml/min 的流體載送速度。

實驗結果發現，如圖九所示，當流速較快時，其偵測到的苯胺氧化訊號急遽下降，主要是因為分析物以一定的速度擴散至電極表面，當流速加快時，分析物經過在電極表面的時間縮短，使得分析物縱向擴散擴散至電極面上的量減少，所以當流速高過於 1ml/min 時，得到的苯胺氧化電流也隨著變小。當流速減慢時分析物於管柱中橫向擴散的因素較為顯著，所以得到的苯胺氧化電流變小，另外因為流速變慢，分析物在電極表面停留的時間延長，使得聚苯胺毒化電極的現象趨於嚴重，偵測訊號之再現性明顯變差。故選用苯胺氧化訊號較佳及偵測訊號再現性較好之載送流速以 1 ml/min 為探討條件。

4.2.6 注入體積的探討

由於注入的苯胺之體積直接影響偵測訊號的大小，因此實驗探討苯胺注入的體積，由圖十中顯示，當注入體積增加時，所偵測到苯胺的氧化訊號也隨著增大，可是因為電極表面苯胺量的增加，伴隨著聚苯胺的吸附量也隨著增加，使得電極毒化現象趨於嚴重，電極再生處理效果銳減，嚴重影響偵測訊號之再現性，故基於偵測訊號之再現性的考量，本研究暫定以再現性最佳的 20 μ l 之注入體積為最適化條件。

4.2.7 苯胺偵測之特性探討

配合了電極再生技術，在 pH=7.5, 0.075M 的磷酸緩衝溶液中，操作電位為 +0.7V(vs. Ag/AgCl)，流速 0.6ml/min，注入體積為 100 μ l 時偵測苯胺，所得校正曲線如圖十一所示。其限性範圍達 165 μ M (correlation coefficient=0.9997)。偵測極限為 0.05 μ M (S/N=3)，對 150 μ M 的苯胺做偵測，得到 95% 電流訊號所需的反應時間為 4.83 秒，連續對 150 μ M 之苯胺重覆 20 次偵測，得到的相對標準偏差 RSD=0.621%。結果整理於表(一)。

結論

本研究成功的利用 FIA/HPLC 配合電化學偵測方法直接偵測苯胺，並配合脈衝電極再生技術來避免電化學上直接偵測苯胺所造成的毒化現象；由於脈衝再生方法的操作簡便，處理

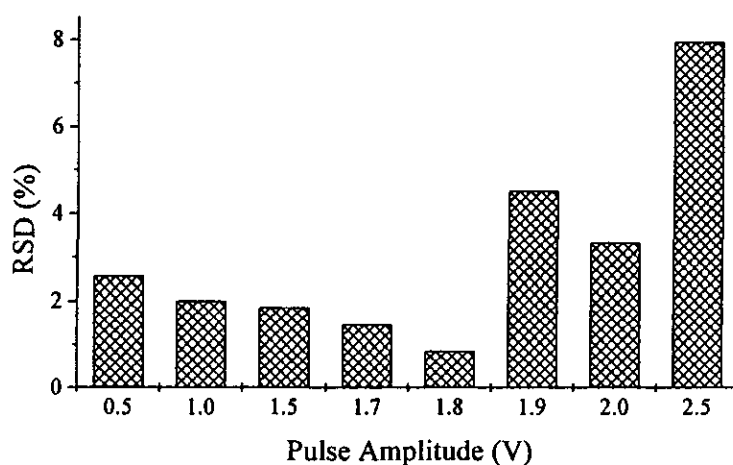
時間短，解決了傳統電極再生方法中的操作繁複以及耗費時間之困擾。利用本系統不但達到方便、快速及靈敏的偵測目標，而且也可以將偵測極限延伸至符合美國環保署公佈的危險劑量標準。

五、參考文獻

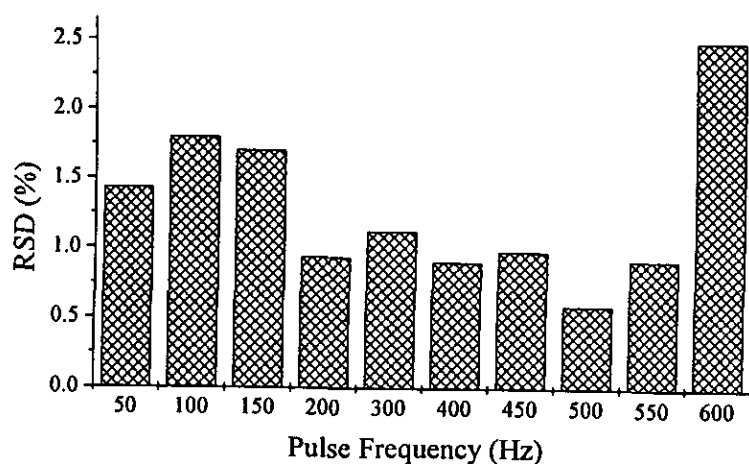
1. M. F. Khan, B. S. Kaphalia and G. A. S. Ansari., *J. Toxicol. and Environ. Health*, **1995**, *44*, 415.
2. M. F. Khan, X. Wu, B. S. Kaphalia, P. J. Boor, and G. A. S. Ansari., *Toxico. Letter*, **1997**, *92*, 31.
3. 小西謙三和黑木宜彥，工業合成染料化學，復漢出版社，**1981**，台南市。
4. *Chem. Eng. News* **1992**
5. M. F. Khan, B. S. Kaphalia, P. J. Boor, and G. A. S. Ansari., *Arch. Envi. Contam. Toxicol.*, **1993**, *24*, 368.
6. M. F. Khan, B. S. Kaphalia, and G. A. S. Ansari., *J. Toxicol. and Environ. Health*, **1995**, *44*, 415.
7. A. P. Bearden and T. W. Schultz, *Envi. Toxicol. and Chem.*, **1997**, *16*, 1311.
8. EPA, <http://www.epa.gov/ngispgm3/iris/subst/0350.htm>
9. P. V. Zoonen, D. A. Kamminga, C. Gooijer, N. H. Velthorst and R. W. Frei, *Anal. Chem.*, **1986**, *58*, 1245.
10. T. Imasaka, K. Tashiro and N. Ishibashi, *Anal. Chem.*, **1986**, *58*, 3242.
11. S. D. Huang, C. P. Cheng and Y. H. Sung, *Anal. Chim. Acta*, **1997**, *343*, 101.
12. Ming J. W. Chang, Y. C. Su and R. S. Lin, *Bull. E. Contam. Toxicol.*, **1992**, *49*, 694.
13. E. M. Lores, F. C. Meekins and R. F. Moseman, *J. Chrommato.*, **1980**, *188*, 412.
14. A. A. Humffray, *Electroanal. Chem. and Interfacial Electrochem.*, **1973**, *42*, 327.
15. M. Poon and R. L. McCreery, *Anal. Chem.*, **1986**, *58*, 2745.
16. D. T. Fafan, I. F. Hu and T. Kuwana, *Anal. Chem.*, **1985**, *57*, 2759.
17. 68. L. E. Welch, W. R. LaCourse, D. A. Mead, and D. C. Johnson, *Anal. Chem.*, **1989**, *61*, 555.
18. R. J. Taylor and A. A. Humffray, *Electroanal. Chem.*, **1973**, *42*, 347.
19. I. F. Hu, D. H. Karweik, and T. Kuwana, *J. Electroanal. Chem.*, **1985**, *188*, 59.
20. K. J. Stutts, P. M. Kovach, W. G. Kuhr and R.

- M. Wightman, *Anal. Chem.*, **1983**, *55*, 1632.
21. D. T. Fafan, I. F. Hu and T. Kuwana, *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 2759.
 22. M. Poon and R. L. McCreery, *Anal. Chem.*, **1986**, *58*, 2745.
 23. M. Poon and R. L. McCreery, *Anal. Chem.*, **1987**, *59*, 1615.
 24. R. C. Koile and D. C. Johnson, *Anal. Chem.*, **1979**, *51*, 741.
 25. L. E. Welch, W. R. LaCourse, D. A. Mead, and D. C. Johnson, *Anal. Chem.*, **1989**, *61*, 555.
 26. T. Nagaoka and T. Yoshino, *Anal. Chem.*, **1986**, *58*, 1037.
 27. Y. Maeda, Y. Okemoto and M. Inagaki, *J. Electrochem. Soc.*, **1985**, *132*, 2369.
 28. R. C. Engstrom and W. V. Strasser, *Anal. Chem.*, **1985**, *57*, 2759.
 29. L. J. Kepley and A. J. Bard, *Anal. Chem.*, **1988**, *60*, 1459.
 30. N. Cenas, J. Rozgaite, A. Pocius and J. Kulys, *J. Electroanal. Chem.*, **1983**, *154*, 121.
 31. J. F. Evans, T. Kuwana, M. T. Henne and G. P. Royer, *J. Electroanal. Chem.*, **1977**, *49*, 1632.
 32. C. W. Miller and D. H. Karweik, *J. Electroanal. Chem.*, **1981**, *53*, 2319.
 33. J. Wang and M. S. Lin, *Anal. Chem.*, **1988**, *60*, 499.
 34. J. Wang and L. D. Hutchins, *Anal. Chim. Acta*, **1985**, *167*, 325.
 35. J. Ruzicka and E. H. Hansen, *Flow Injection Analysis 2nd ed.*, **1988**, Wiley, New York.
 36. L. Gorton, H. I. Karan, P. D. Hale, T. Inagaki, Y. Okamoto and T. A. Skotheim, *Anal. Chim. Acta*, **1990**, *228*, 23.
 37. A. Amine, J. M. Kauffmann and G. J. Patriarche, *Talanta*, **1991**, *38*, 107.
 38. K. W. M. Siu, G. J. Gardner and S. S. Berman, *Anal. Chem.*, **1989**, *61*, 2320.
 39. M. J. Hayward, T. Kotiaho, A. K. Lister, R. G. Cooks, G. D. Austin, R. Narayan, and G. T. Tsao, *Anal. Chem.*, **1990**, *62*, 1798.
 40. S. V. Olesik, S. B. French and M. Novotny, *Anal. Chem.*, **1986**, *58*, 2256.
 41. S. Garrigues, M. Gallignani and M. D. L. Guardia, *Talanta*, **1993**, *40*, 89.
 42. J. B. Callis, D. L. Illman and B. R. Kowalski, *Anal. Chem.*, **1987**, *59*, 624A.
 43. D. Betteridge, *Anal. Chem.*, **1978**, *50*, 832A.
 44. H. J. Wieck and G. H. Heider, *Anal. Chim. Acta.*, **1984**, *158*, 137.
 45. R. Appelqvist and G. M. Varga, *Anal. Chim. Acta.*, **1985**, *169*, 237.
 46. G. J. Moodu and G. S. Sanghera, *J. Americ. Chem. Soc.*, **1986**, *111*, 1235.
 47. F. Winquist and I. Lundstrom, *Anal. Chem.*, **1986**, *58*, 145.
 48. I. Yoshihito, S. Yamauchi, T. Yukiashi, H. Ushioda and M. Aizawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1989**, *62*, 1869.
 49. L. Jemneus and L. Gorton, *Anal. Chem.*, **1990**, *62*, 263.
 50. A. J. Bard and G. Inzelt, *Electroanal. Chem.*, **1994**, V.18, Marcel Dekker, Inc., New York.
 51. A. J. Bard and R. L. McCreery, *Electroanal. Chem.*, **1994**, Vol.17, Marcel Dekker, Inc., New York.
 52. L. J. Kepley and A. J. Bard, *Anal. Chem.*, **1988**, *60*, 1459.
 53. L. J. Kepley and A. J. Bard, *Anal. Chem.*, **1988**, *60*, 1459.
 54. D. A. Skoog, D. M. West and F. J. Holler, *Fund. Anal. Chem.*, sixth edition, **1992**, Saunders, New York.

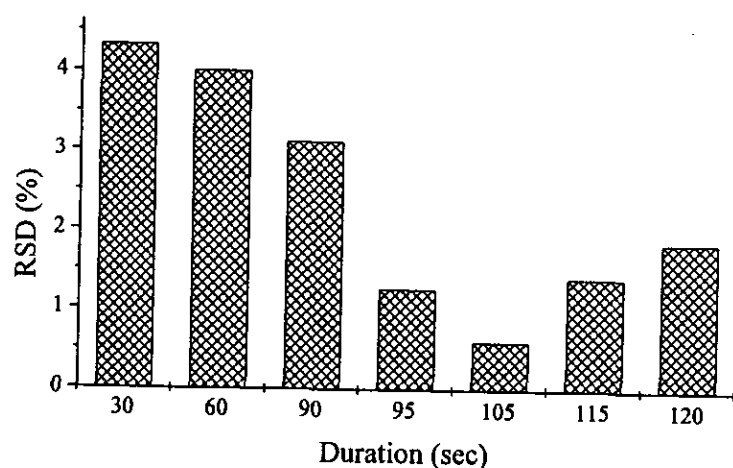
六、圖表



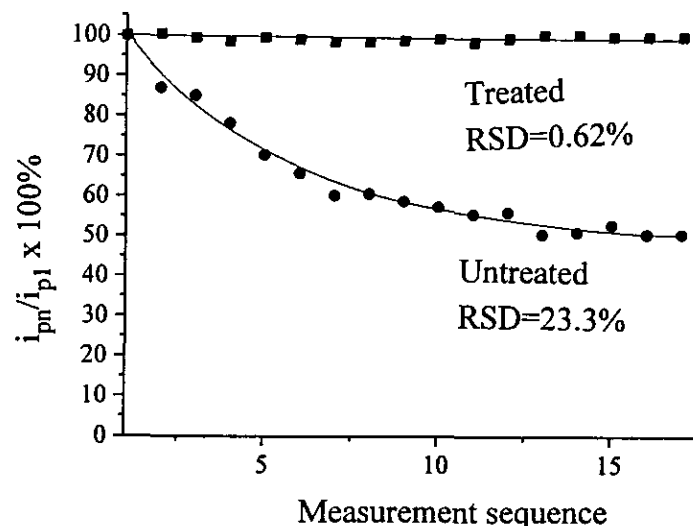
圖一 脈衝強度的探討，未修飾過的玻璃碳電極，於 +700mV(vs. Ag/AgCl) 下偵測 150 μ M 苯胺，並於偵測後對不同的脈衝強度之處理效果。電解質溶液為 0.05M、pH7 之 succinic buffer、流速為 1 ml/min、注入分析物體積為 20 μ l、脈衝頻率 500Hz、處理時間 1 分 45 秒。



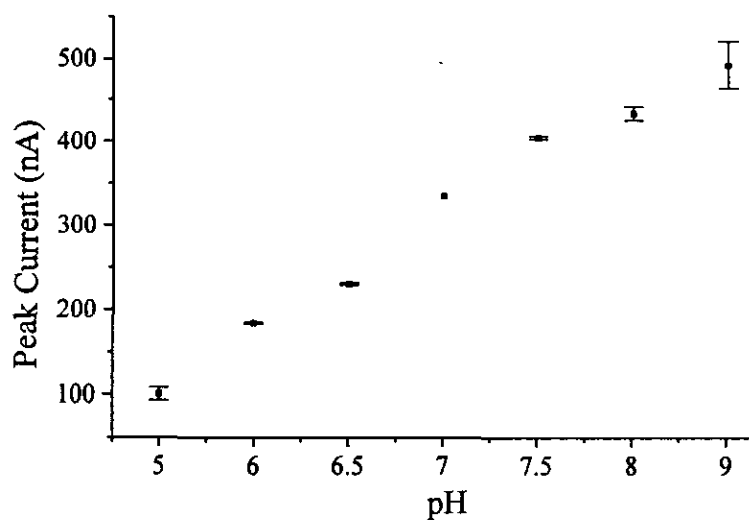
圖二 脈衝頻率的探討，未修飾過的玻璃碳電極，於+700mV(vs. Ag/AgCl)下偵測 150 μ M 苯胺，並於偵測後對不同的脈衝頻率之處理效果。脈衝強度 ± 1.8 V，其餘操作條件與圖一同。



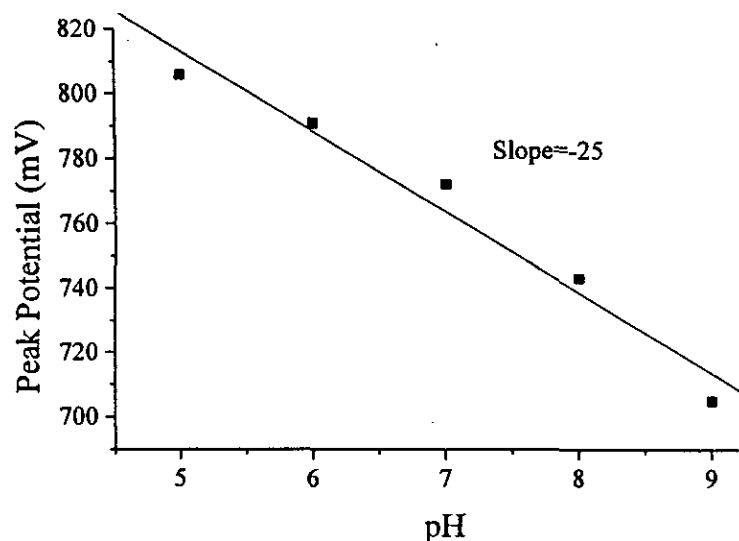
圖三 施加脈衝的時間長度之探討，未修飾過的玻璃碳電極，於+700mV(vs. Ag/AgCl)下偵測 150 μ M 苯胺，並於偵測後對不同的脈衝處理時間之處理效果。脈衝頻率 500Hz，其餘操作條件與圖二同。



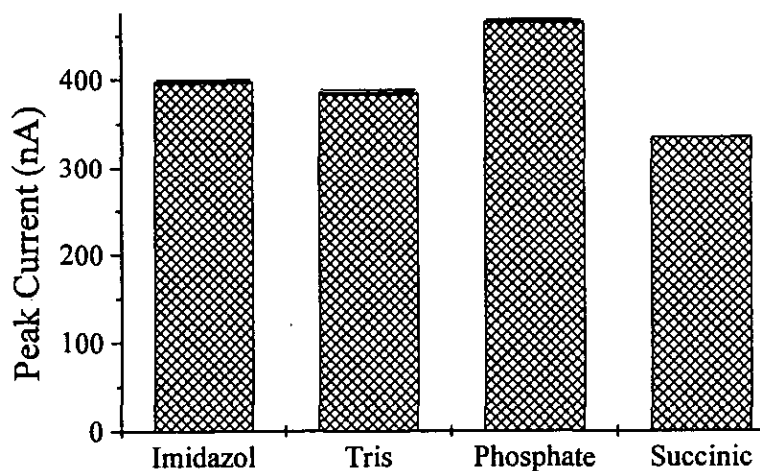
圖四 施予脈衝處理與未處理偵測訊號之比較，未修飾過的玻璃碳電極，於+700mV(vs. Ag/AgCl)下偵測 150 μ M 苯胺，有施加脈衝電極再生處理(A)、未處理(B)之電極連續偵測苯胺 18 次電流訊號之變化。電解質溶液為 0.075M、pH7.5 之 phosphate buffer、流速為 1 ml/min、注入分析物體積為 20 μ l、脈衝強度 ± 1.8 V、脈衝頻率 500Hz、處理時間 1 分 45 秒。



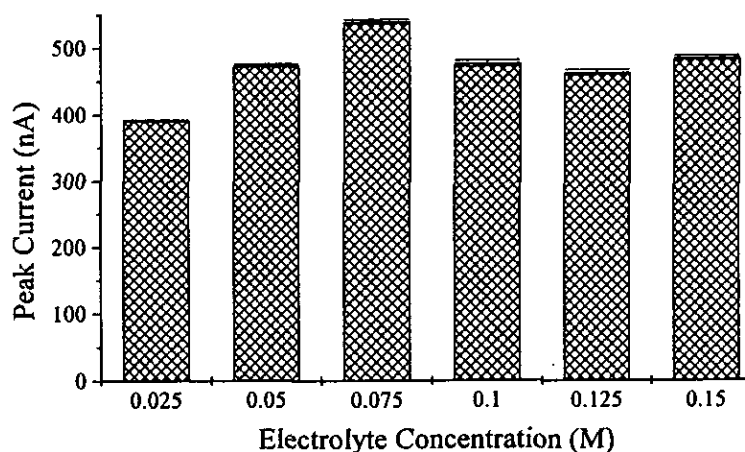
圖五 溶液 pH 值探討，未修飾過的玻璃碳電極，於不同 pH 值之緩衝溶液中對 150 μ M 苯胺之偵測訊號。偵測電位固定在 +700mV(vs. Ag/AgCl)，其餘操作條件與圖三同。



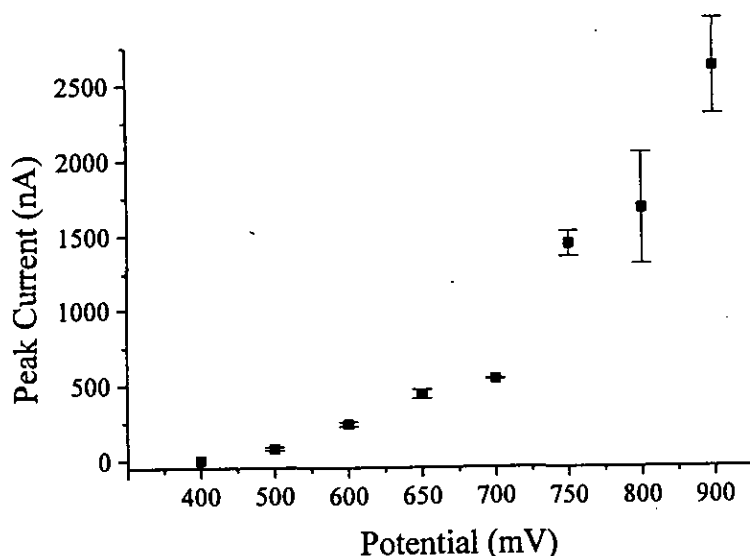
圖六 溶液 pH 值對 peak potential 的探討，未修飾過的玻璃碳電極，於不同 pH 值之緩衝溶液中對 150 μ M 苯胺之半波電位。掃瞄範圍從 -200mV 至 +1200mV、掃瞄速率 50mV/sec、電解質溶液為 0.075M 之 phosphate buffer。



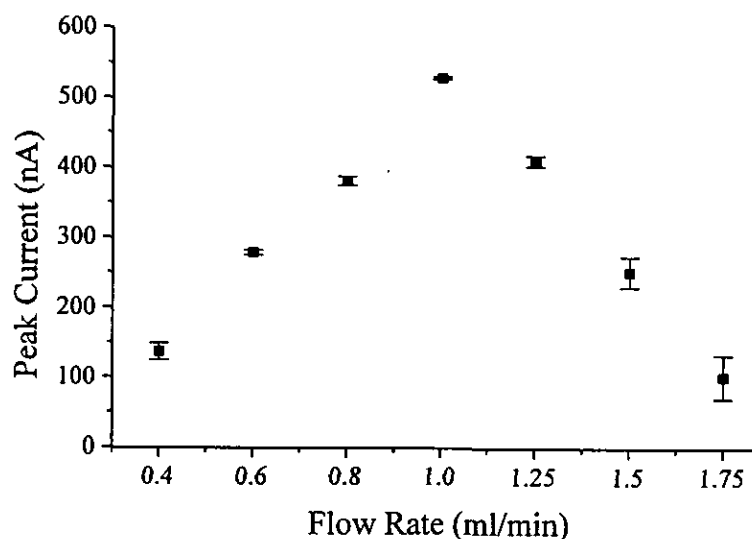
圖七 電解質的探討，未修飾過的玻璃碳電極，於 0.05M pH7.5 之各種緩衝溶液中對 150 μ M 苯胺之偵測訊號。其餘操作條件與圖五同。



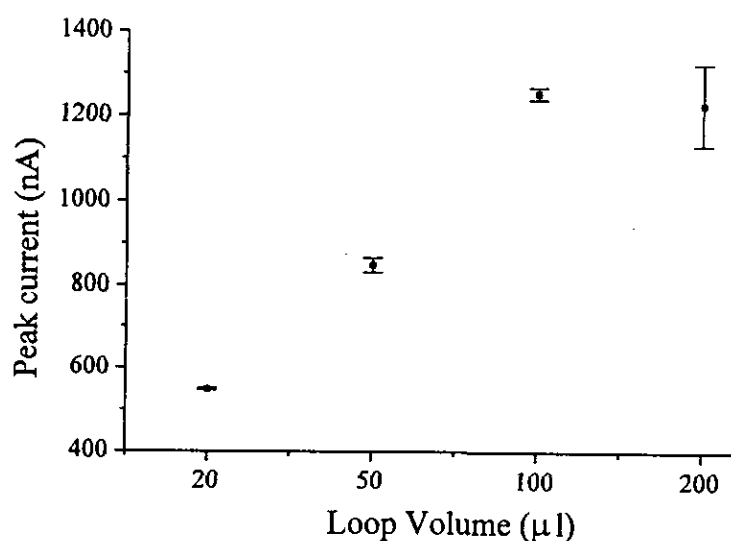
圖八 電解質濃度的探討，未修飾過的玻璃碳電極，於不同濃度 pH7.5 之 phosphate buffer 中對 150 μ M 苯胺之偵測訊號。其餘操作條件與圖七同。



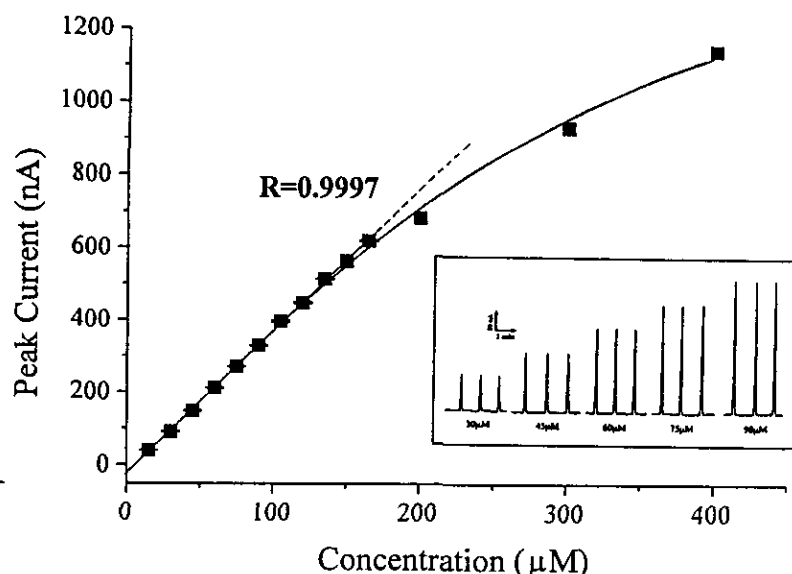
圖九 偵測電位探討，未修飾過的玻璃碳電極，於 0.075M pH7.5 phosphate buffer 不同操作電位下對 150 μ M 苯胺偵測之電流訊號，其餘操作條件與圖八同。



圖十 流體流速探討，未修飾過的玻璃碳電極，操作電位固定在+700mV(v.s Ag/AgCl)，於不同的載送流速下對150 μ M 苯胺之偵測訊號。其餘操作條件與圖八同。



圖十一 注入分析物體積探討，未修飾過的玻璃碳電極，載送流速為1ml/min，於不同注入體積之150 μ M 苯胺的電流訊號。其餘操作條件與圖八同。



圖十二 苯胺偵測校正曲線，未修飾過的玻璃碳電極，對苯胺之電流訊號。其餘操作條件與圖八同。

表一 苯胺偵測之特性

操作條件	Apply E=+700mV 0.075M pH=7.5 phosphate buffer flow rate=1ml/min loop volume=20 μ l
電極再生條件	pulse high= \pm 1.8V frequency=500Hz Duration=105sec
線性範圍	165 μ M R=0.9997 (21.384 ppm 或 427.68ng/20 μ l)
偵測極限	0.05 μ M (S/N=3) (6.48ppb 或 129.6pg/20 μ l)
反應時間	4.83 秒
相對標準偏差	0.621%

PART II

Trace Measurement of Dithiocarbamate Based Pesticide by Adsorptive Stripping Voltammetry

Abstract(Keywords: Zineb, Zinc(II) dithiocarbamate, Pesticide, Trace Measurement, Adsorptive Stripping Voltammetry)

This paper reported a sensitive and rapid scheme of adsorptive stripping voltammetry to measure a dithiocarbamate based pesticide, Zineb, cathodically. Zineb forms an insoluble complex with mercury on the electrode surface and is subsequently determined by a cathodic scan. Zineb can be preconcentrated at -0.3 volts (vs. Ag/AgCl), in this case, onto a mercury drop electrode with a surface area of 0.0133 cm² per drop. Subsequently, the accumulated Zineb species can be measured by scanning the potential negatively to -0.7 volts. Thus, the necessary sensitivity can be enhanced more than 15 times with a preconcentration time of 120 seconds to meet the requirement of Acceptable Daily Intakes (ADIs). The linear range of a calibration plot can reach up to 1 μ M and the sensitivity is 759.85 nA per μ M with a correlation coefficient of 0.99996. The detection limit of S/N=3 is 1 nM. A relative standard deviation of 3.8% is obtained from a series of fifteen repetitive measurements of 0.4 μ M Zineb.

2. Introduction

Residue of pesticides found in agriculture products, drinking water, and environmental exposure has raised much concern from the general public in recent years⁽¹⁻²⁾. Thousands of pesticides of various types-insecticides, bactericides, fungicides, herbicides, rodenticides or fumigants are used in large quantity annually. The major purpose of designing these chemicals intends for destroying pests and improving productivity. However, residuals of these compounds in the foodstuffs or in the environment also postulate a serious threat to public health.

Various schemes have been reported for the determination of Zineb by high performance liquid chromatography,⁽³⁻⁴⁾ spectrophotometry,⁽⁵⁻¹⁰⁾ colorimetry,⁽¹¹⁾ gas chromatography(GC)⁽¹²⁾ and/or mass spectrometry(MS).⁽¹³⁾ Several

studies have been used to investigate thiourea pesticides.⁽¹⁴⁻¹⁶⁾ Earliest electrochemical study of Zineb involved with a polarographic determination.⁽¹⁷⁾ An anodic adsorptive stripping voltammetric technique has been reported for its detection of ziram.⁽¹⁸⁾ Basically, the aforementioned schemes are designed to measure the metal ion that dithiocarbamate bounded. However, the most of these schemes are not sensitive enough for ADIs purpose or neurotoxicity, carcinogenicity studies.⁽¹⁹⁾

Zineb is a zinc ethylenebis(dithiocarbamate) fungicide mainly and is used in agriculture, also as a slimicide in water-cooling system, as vulcanization accelerators in sugar industry as well as an antioxidant in rubber industry. Dithiocarbamate possesses thyroid, liver toxicity, is found to be a carcinogenic material in the recent pathology study.⁽²¹⁻²⁴⁾ Dithiocarbamate also is a chelate agent with various metal ions, such as Fe²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Na⁺, and Ni²⁺ to form coordinating complexes and as a fungicide. The toxicity is enhanced significantly if a metal complex is formed.⁽²⁵⁾ Thus, a highly sensitive tool is essential for future investigation of this class of compounds.

Adsorptive stripping voltammetry is a sensitive two-step scheme which possesses an extra preconcentration step prior to the voltammetric scan⁽²⁶⁻²⁷⁾. In contrast to the conventional voltammetry, the enhanced sensitivity of stripping voltammetry is attributed to the accumulation of surface concentration of analyte from preconcentration procedure and is especially suitable for trace analysis. An adsorption process in electrochemical response is an undesired process and may result in electrode poisoning effect. The adsorption phenomena can be utilized here as a scheme to facilitate the surface concentration to improve the sensitivity and the detection limit of voltammetry. There is no paper published by using adsorption stripping voltammetry to measure the dithiocarbamate based pesticides, Zineb.

Our aim is to demonstrate a rapid and a sensitive scheme of cathodic adsorptive stripping voltammetry for the measurement of the dithiocarbamate based pesticides and to study the basic electrochemical behavior of dithiocarbamate

pesticides, especial Zineb. In order to develop a much sensitive scheme to fulfill the required sensitivity of JMPR to measure the dithiocarbamate based pesticides, a surface adsorption behavior of the Zineb can be incorporated into a differential pulsed voltammetry. A surface adsorption behavior is also studied. The measurement principle of Zineb is demonstrated as in Fig. 1.

3. Experimental

3.1. Apparatus

For the adsorptive stripping voltammetric measurements of Zineb, an electrochemical analyzer (Model BAS 100W, Bioanalytical System Inc., West Lafayette, Indiana, USA) was used to control the voltage of a three-electrode system. The voltammetric cell contains a controlled growth mercury drop electrode of size 8 hanging mercury drop electrode (EF-1400, BAS) with a careful calibrated surface area of $0.0133 \text{ cm}^2/\text{drop}$ ($n=5$, RSD 0.74%), a platinum counter electrode (from local supplier), and a Ag/AgCl (MF-2063, BAS) as a reference electrode. The pH measurements were carried out with a Suntex glassy electrode/pH meter (Model SP-701, Suntex, Taipei, Taiwan). The weighting procedure was carried out with a balance (AE-200, Mettler, Zurich, Switzerland). An eppendrof micropipette (Eppendorf Varipette 4810, Eppendorf, Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Germany) was used for precise volumetric measurement.

3.2. Reagents

All the water for stock solutions preparation was purified by a Milli-Q Reagent Water System (Millipore, Bedford, MA, USA) and the prepared solution was stored at 4°C before use. All the electrochemical measurements were conducted in a 0.05M acetate buffer, pH 5 (Riedel-de Haen, RDH, Seelze, Germany). Zineb solution (0.2 mM) was prepared by dissolving 1.1 mg of Zineb powder (Chem Service, West Chester, Pennsylvania, USA) in 20 ml of 0.05M acetate buffer solution daily. Lithium chloride, sodium chloride, potassium chloride, manganese nitrate, calcium oxide, lead acetate, cadmium chloride, phenol, 1,4-dihydroquinone (Riedel-de Haen,

RDH, Seelze, Germany), copper acetate (Katayama Chemical Inc., Japan), sodium dodecyl sulfate (Mallinckrodt, Paris, USA), camphor and humic acid (Aldrich, Milwaukee, WI, USA) stock solutions were prepared in 0.05M acetate buffer solution (pH 5) before use.

3.3 Procedure of Cathodic Stripping Voltammetry

Ten milliliters of acetate buffer solution were pipette into the cell and purged with argon gas for 10 minutes. The preconcentration potential was applied to a fresh mercury drop for a selected time, while the mass convection was controlled at 400 rpm. At this point, stirring was interrupted and 5 seconds later the voltammograms were recorded by scanning the potential, 10 mV/sec over the selected range. The differential pulse stripping cycles were repeated using a new mercury drop. Throughout this operation, an argon atmosphere was maintained constantly over the solution.

4. Results and Discussion

To investigate the basic electrochemical property and the adsorptive behavior of Zineb, a repetitive cyclic voltammogram, CV, for $2 \mu\text{M}$ Zineb was conducted in a 0.05M acetate buffer, pH 5 between -100 and -700 mV (vs. Ag/AgCl). Zineb possesses a profound cathodic stripping peak 644 nA at -455 mV with a peak width at half-height of 32 mV and a smaller anodic peak -40.1 nA at -383 mV in the subsequent scan as in Fig. 2. In contrast to the first CV scan, the second cathodic peak decreases 72.7% rapidly from the previous cathodic scan. Also, the adsorption effect or the thin-layer behavior was identified by the plot of log of stripping current vs. log of scan rate (data not shown). The peak increased linearly between 25 to 500 mV per second with a slope of 1.155 with a correlation coefficient of 0.9971. These results indicate the zinc ethylene bis(dithiocarbamate) possesses a strong adsorptive behavior on a mercury electrode surface and that is well suitable to develop an adsorptive stripping measurement.

The surface coverage can also be calculated from the quantity of electrons consumed charge by the surface adsorption layer during the cyclic voltammetry. At concentration of $0.4 \mu\text{M}$ Zineb, full surface coverage was observed at 10 minutes

preconcentration time. Division of the total charge consumed, 3.612 μC , by the conversion factor, nFA, yields a surface coverage of 1.875×10^{-11} mole per cm^2 at $n=2$. Thus, the area of an adsorbed molecular occupied area of 11.8 \AA^2 .

The adsorption behavior of Zineb is of particular important to be used as a factor to enhance the sensitivity of voltammetry. The sensitivity of adsorptive stripping voltammetry depends on the preconcentration time and the preconcentration potential. In 1993 the Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues, JMPR, concluded the individual ADIs is 0-0.03 mg/Kg bw.⁽¹⁹⁾ Thus, a detection limit($S/N=3$) of 1 nM is targeted. Fig. 3 shows that increasing current response is observed from 0 upto 600 seconds and a gradually decreasing current after 600 seconds preconcentration time. Thus, the preconcentration time of 120 seconds was used for the subsequent studies to meet the JMPR's ADIs requirement. In contrast to the differential pulse stripping voltammetry, no sensitivity enhancement is observed from Osteryoung square wave stripping voltammetry that may attribute to the irreversible electrochemical behavior of Zineb.

The preconcentration potential also is a major factor affecting the response sensitivity. A series of preconcentration potentials between -0.10 and -0.60 volts with 0.050 volts apart from each neighboring potential were studied. Fig. 4 shows the optimum preconcentration potential condition is between -0.30 and -0.10 volts. The sensitivity decreases sharply at potential less than -0.30 volts and only limited sensitivity is observed between -0.40 and -0.60 volts. Thus, an optimum preconcentration potential of -300 mV was used in the subsequent studies to have the shortest scan range or to achieve the most optimum measurement speed.

The conditions of electrolyte, such as the type of electrolyte and pH are the additional key factors affecting the sensitivity of stripping voltammetry. Various electrolytes of 0.05M at pH 5 were used to investigate the response intensity among different buffers to the injection of $0.4 \mu\text{M}$ Zineb with a preconcentration time of 120 seconds. The result of electrolyte study indicates the acetate buffer possesses the most ultimate

response of 303.1 nA for the detection of Zineb at the presence of $0.4 \mu\text{M}$ Zineb. In contrast, the other electrolytes/buffer of phosphate buffer, succinic buffer and citric buffer at pH 5 have less sensitive responses of 287.4 nA, 241.0 nA, and 179.7 nA, respectively. Also, an ionic strength effect to the injection of $0.4 \mu\text{M}$ Zineb was studied at 0.01, 0.25, 0.050, 0.100, 0.200, and 0.500 M acetate buffer were studied, other conditions as in Fig. 4. The result indicates the electrolyte concentration at 0.05 M is the most optimum concentration for the detection.

In the previous study, we found the peak potential of Zineb is pH dependent. In the peak potential versus pH plot (plot not shown), a slope of 51.8 with correlation coefficient of 0.9988 is observed. Since the acidity of the buffer solution is also an important parameter to be optimized in the stripping voltammetry, we also conducted an experiment to measure current responses at various pH to the injection of $0.4 \mu\text{M}$ Zineb into 0.05M acetate buffer at scan rate of 50 mV/sec with 2 minutes preconcentration time. Fig. 5 indicates that the optimum pH value of acetate buffer solution is around 4.5 to 5.0. Subsequently, all the buffer pH was maintained at pH 5 for the further studies.

Fig. 6 shows the dependence of the adsorptive stripping current to a series of standard addition of Zineb with concentration ranging from $0.2 \mu\text{M}$ upto $3.5 \mu\text{M}$ at five various different preconcentration time. The Fig. 6 also shows that the sensitivity of each calibration plots at various preconcentration time possess sensitivity of 759.85, 524.38, 313.21 and 161.342 nA per μM at preconcentration time of 120(e) 90(d), 60(c), and 30(b) seconds, respectively. In contrast, limited current was observed in the corresponding voltammetric scan without preconcentration step(a). Thus, this calibration plot also implies the sensitivity and/or the measurement speed can be selected either by both preconcentration times and/or measurement speed. According to expectation the calibration plots with a shorter preconcentration period possess a less sensitivity but a longer linear range as Fig. 6, (b and c). However, the calibration curves level off at lower concentrations with longer preconcentration time as in Fig. 6 (d and e). A

further study on preconcentration time was investigated between 0 and 1200 seconds. In contrast to the original peak potential of Zineb (-0.424 volts), the further addition of Zineb (at concentration higher than 2 μM with 120 seconds preconcentration time) results in a new peak at -0.478 volts with sensitivity of 221.46 nA/ μM . Based on a signal to noise ratio of 3, the detection limit of 120 seconds preconcentration time is estimated for 1nM when a concentration of 4 nM Zineb was added into an acetate buffer at pH 5. In repetitive fifteen measurements of 0.4 μM Zineb, the response data possess a mean peak current of 312.7 nA ranging from 294.4 to 335.04 nA with relative standard deviation of 3.86%.

Finally, the possible interference species were investigated by the addition of various amount of interference substances at the presence of 0.4 μM Zineb, other operational conditions are same as the Fig. 6. The interference substances used in this investigation include copper(II), lead(II), cadmium(II), Iron(II), hemoglobin, sodium dodecyl sulfate, gelatin, humic acid and camphor. The result indicates there are sever interference were observed about 65 %, 7.6 %, 18.5%, 19%, and 26 % of signal decreased from the addition of metal ions or compounds, such as 0.2 μM copper(II), 0.4 μM lead(II), 0.4 μM cadmium(II), 3.2 μM Iron(II), 4 μM hemoglobin, respectively. These may attribute to the dithiocarbamate competition reaction between zinc ions over the other metal ions. There are 32.4, 38, 69 and 30.2 % of signal decreased at the presence of 0.4 μM of Zineb for the addition of interference, such as, 4 ppm humic acid, 6 ppm sodium dodecyl sulfate, 1 % gelatin, and 6 ppm camphor, respectively. The observation may attribute to the adsorption of those molecules which causing the hindrance of electron transfer reaction to occur.

We have demonstrated the feasibility of using adsorptive stripping voltammetry as a sensitive scheme for the measurement of a metal bis(dithiocarbamate) based pesticides. This scheme of measurement dithiocarbamate based pesticides provides a sensitive and rapid scheme for a routine analysis as well as providing a convenient tool to estimate the impact toward human health. This scheme is also sensitive

enough to meet the requirement of the individual ADIs or 0-0.03 mg/Kg bw which was predetermined by 1993 the Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. The peak potentials of different metal ion bis(dithiocarbamate) may vary from one to the other which is attributed to the difference between various formation constants. This scheme is also applicable to the measurement of other metal dithiocarbamate pesticides, such as Maneb, Nabam, Ferbam, etc. In the calibration plots of other metal dithiocarbamates, Maneb, Nabam, Ferbam possess a sensitivity with slopes of 563.9, 874.6 and 247.7 nA per μM , respectively (data not shown). While the most optimum operational conditions of other dithiocarbamate compounds need to be investigated future in the future application

5. Acknowledgment

We are grateful for the financial support from the National Science Council in Taiwan (Grand No. NSC 88-2113-M-032-001-).

6. References

- [1] D. Hanson, Chem. & Engineer. News, May 4 (1998) pp. 38.
- [2] B. Hileman, Chem. & Engineer. News, Nov. 18 (1998) pp. 24.
- [3] K. H. Gustafsson and R. A. Thompson, J. Agric. Food Chem., 29 (1981) 729.
- [4] C. C. Lo, M. H. Ho and M. D. Hung, J. Agric. Food Chem., 44 (1996) 2720.
- [5] A. L. J. Rao and N. Verma, *Talanta*, 36 (1989) 1041.
- [6] A. K. Malik and A. L. J. Rao, *Talanta*, 37 (1990) 1205.
- [7] A. K. Malik and A. L. J. Rao, *Talanta*, 38 (1991) 941.
- [8] L. Mathew, T. P. Rao, C. S. P. Iyer and A. D. Damodaran, *Talanta*, 42 (1995) 41.
- [9] A. K. Malik and A. L. J. Rao, *Talanta*, 44 (1997) 177.
- [10] R. Kesari and V. K. Gupta, *Talanta*, 45 (1998) 1097.
- [11] Verma, B. C., Sood, R. K., and Sidhu, H. S., *Talanta*, 30 (1983) 787.
- [12] N. Ahmad, L. Guo, P. Mandarakas, V. Farah, S. Appleby and T. Gibson, J. AOAC Inter., 79

(1996) 1417.

[13] R. Pastorelli, R. Allevi, S. Romagnano, G. Meli, R. Fanelli and Airoidi, Arch. Toxicol., 69 (1995) 306.

[14] M. R. Smyth and J. G. Osteryoung, Anal. Chem., 49 (1977) 2310.

[15] R. R. Quadrel and F. M. Bogdansky, J. Chromatogr. Sci., 18 (1980) 622.

[16] M. J. Spiro and R. G. Spiro, Anal. Biochem., 204 (1992) 152.

[17] A. L. J. Rao and N. Verma, Bull. Electrochem., 6 (1990) 439.

[18] L. Mathew, M. L. P. Reddy, T. P. Rao, C. S. P. Iyer and A. D. Damodaran, Talanta, 43 (1996) 73.

[19] G. Vettorazzi, W. F. Almeida, G. J. Burin, R. B. Jaeger, F. R. Puga, A. F. Rahde, F. G. Reyes and S. Schvartsman, Teratogen. Carcinogen & Mutagen., 15 (1995) 313.

[20] C. Nebbia and J. Fink-Gremmels, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 56 (1996) 847.

[21] L. Soleo, G. Defazio, R. Scarselli, R. Zefferino, P. Livrea, and V. Foa, Arch. Toxicol., 70 (1996) 678.

[22] M. Marinovich, M. Guizzetti, F. Ghilardi, B. Viviani, E. Corsini and C. L. Galli, Arch. Toxicol., 71 (1997) 508.

[23] K. Savolainen and H. Hervonen, Arch. Toxicol. Suppl., 8 (1985) 272.

[24] H. V. Ghate, Geobios, 12 (1985) 182.; ibid., 13 (1986) 82.

[25] K. Borg and H. Tjaelve, Toxicol. Lett., 42 (1988) 87.

[26] J. Wang, Stripping Analysis, VCH Publishers, New York, 1985.

[27] J. Wang and M. S. Lin, J. Electroanal. Chem., 221 (1987) 257.

7. Figure and Table

Schematic of Zineb Determination

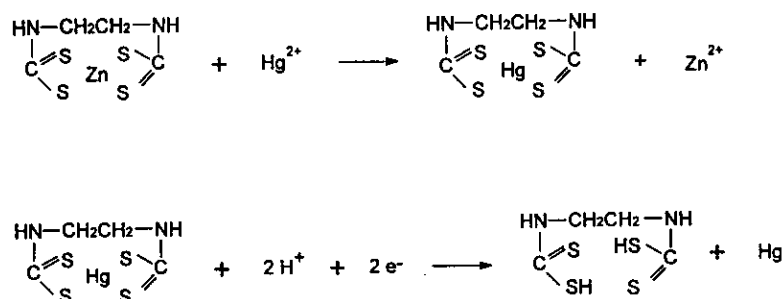


Fig. 1. Schematic description of measurement principle for Zineb.

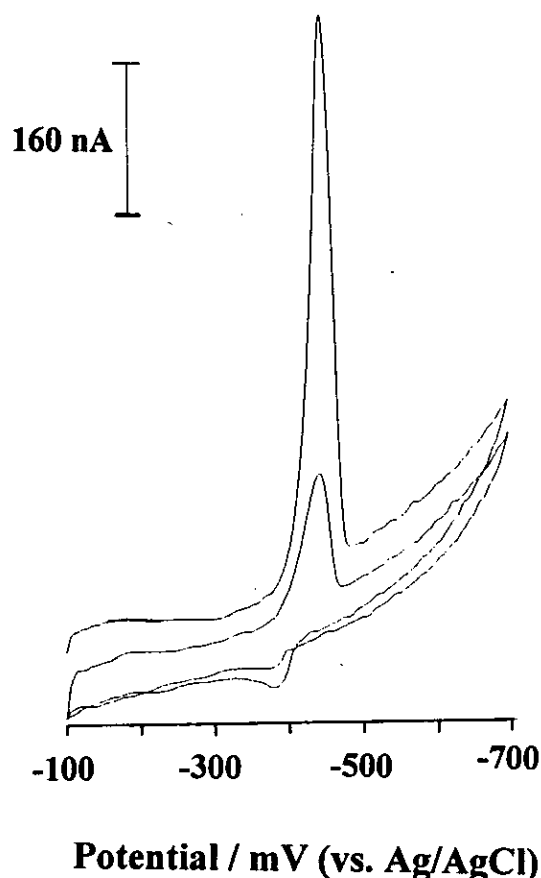


Fig. 2. Repetitive cyclic voltammograms for 0.4 μM Zineb in a 0.05M acetate buffer solution (pH 5.0); Scan rate 50mV/sec. Preconcentration conditions : 120 seconds, at -0.3V (vs. Ag/AgCl) and rotating speed at 400 rpm.

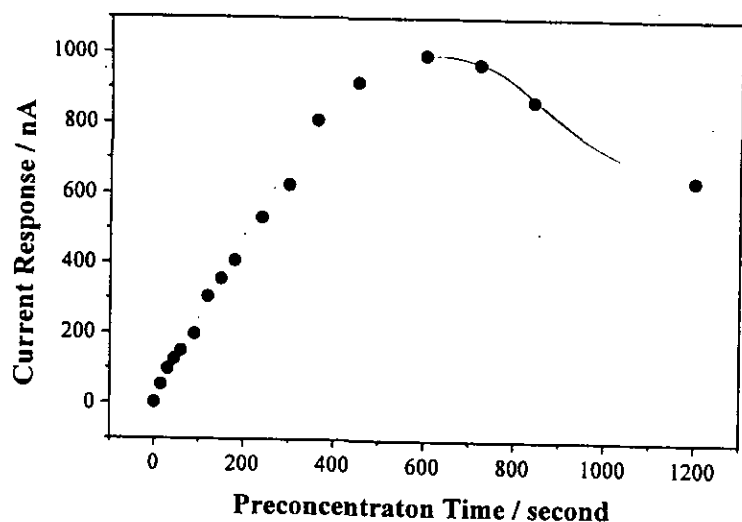


Fig. 3. Effect of preconcentration time study for 0.4 μM Zineb. Other conditions as in Fig 2.

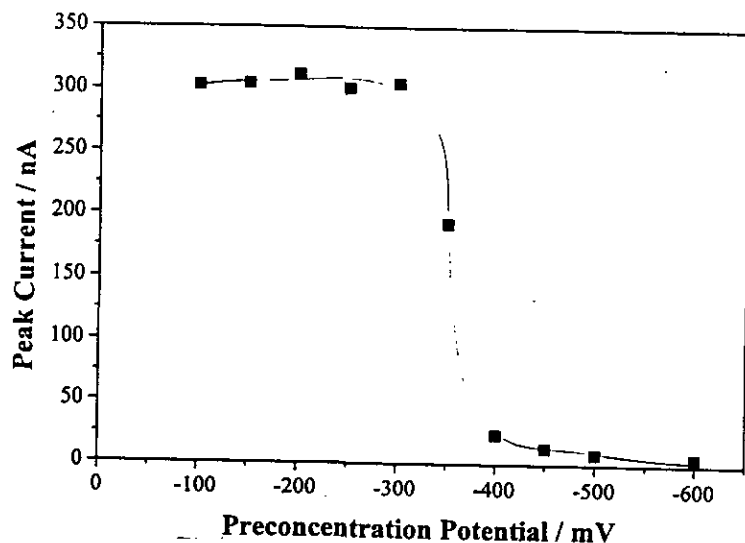


Fig. 4. Effect of preconcentration potential study on the differential pulse stripping voltammograms, Other conditions as in Fig 3.

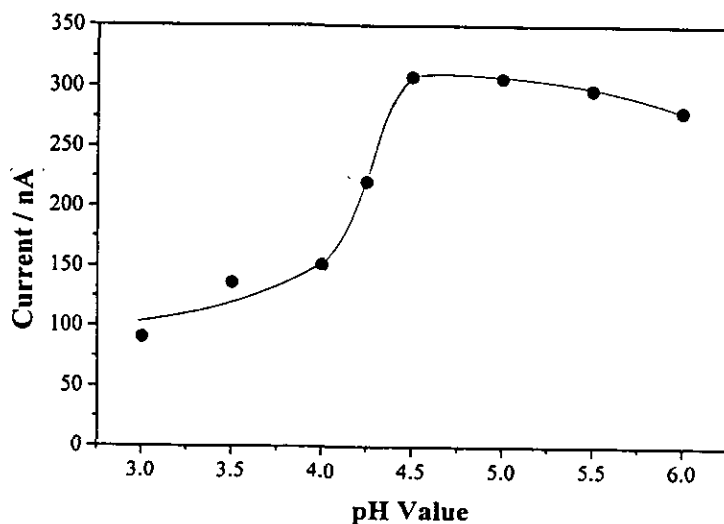


Fig. 5. Effect of the pH study. The reposed current at various pH of differential pulse stripping voltammograms for 0.4 μM Zineb. Other conditions as in Fig 4.

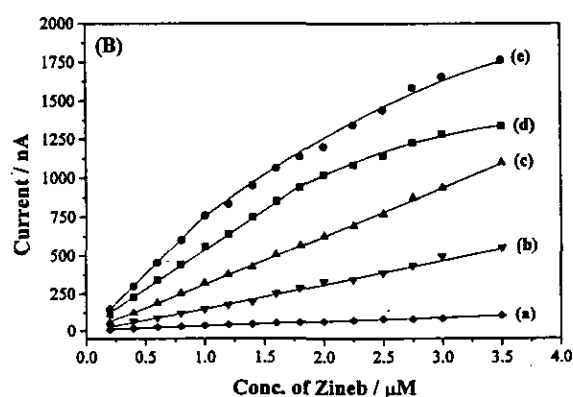
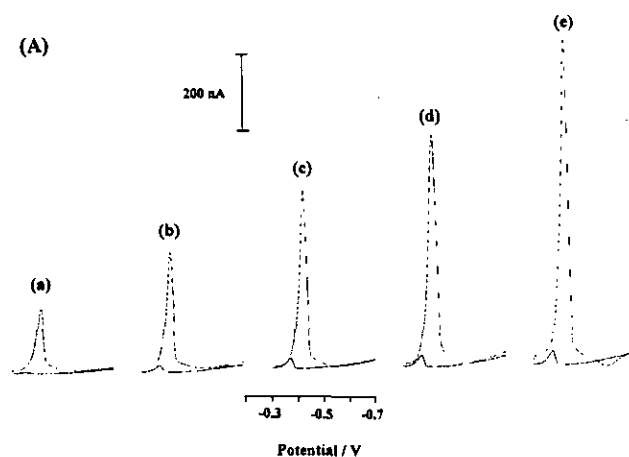


Fig. 6. Adsorptive stripping voltammograms(A) obtained for solution of increasing zineb concentration from 0.2 to 2 μM at various preconcentration time of 0.2(a), 0.4(b), 0.6(c), 0.8(d), and 1.0(e) μM Zineb. The dotted lines indicate the responses of corresponding concentration without any preconcentration step. Also shown are the current vs. concentration plots(B) after different preconcentration times: 0 (a); 30 (b); 60 (c); 90 (d) and 120 (e) seconds.

我們亦執行了 Thiabendazole Pesticide 的偵測工作，數據正在處理中。